

文章编号: 1000-0615(2006)05-0627-06

真鲷鳃组织 cDNA 文库的构建与 hepcidin 抗菌肽基因序列的扩增

杨明^{1,2}, 王克坚^{1,2}, 曲海东^{1,2}, 李少菁¹

(1. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以细菌攻毒的真鲷鳃组织为材料, 分离出 mRNA, 合成双链后, 回收 500~4 000 bp cDNA 片段, 构建了 λ ZAP 表达型 cDNA 文库。初级文库的容量为 1.75×10^5 个重组子, 扩增文库的滴度达到 1×10^9 pfu·mL⁻¹, 随机挑选噬菌斑的插入片段在 500~2 000 bp 之间。以 hepcidin 特异性引物做 PCR 扩增文库, 获得了 hepcidin 抗菌肽基因 cDNA 序列, 证明所建立的文库可用于免疫相关基因的筛选。本文库可作为筛选真鲷免疫相关基因的重要资源。

关键词: 真鲷; cDNA 文库; 抗菌肽; hepcidin

中图分类号: Q 785; S 917 文献标识码: A

Construction of cDNA library of gills from *Pagrus major* with the cloning of hepcidin

YANG Ming^{1,2}, WANG Ke-jian^{1,2}, QU Hai-dong^{1,2}, LI Shao-jing¹

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: With the layers of mucus and nonspecific immune defenses, the fish gill is exposed to the external environment and forms the initial barrier to invasion by pathogens. As one of the mucosa-associated lymphoid tissues in teleost fishes, gill contains populations of leucocytes. In order to probe the immune-related genes in red seabream (*Pagrus major*), the cDNA library of gills was constructed from the red seabream inoculated with several species of pathogenic bacteria. The total RNA was extracted by TRIZOL and mRNA was isolated by biotin oligo (dT). Then, cDNA was synthesized from 5 μ g mRNA. Through running gel electrophoresis of double strand cDNA, the fragments of 500–4 000 bp were harvested, concentrated, ligated with λ ZAP vector and packaged *in vitro*. The primary cDNA library contained 1.75×10^5 recombinants. The titer of amplified library was tested up to 1×10^9 pfu·mL⁻¹, and the insert size of random picked phagemid was between 500–2 000 bp. PCR with specific primers of hepcidin was performed to cloning of the homologous genes from cDNA library and a fragment of hepcidin cDNA sequence was amplified. The identity was above 85% in comparison with the hepcidin cDNA isolated from the liver of also red seabream. Therefore, the construction of cDNA library provides the basis for screening immune-related genes from red seabream.

Key words: *Pagrus major*; cDNA library; antimicrobial peptide; hepcidin

真鲷 (*Pagrus major*) 是我国重要的海水鱼类养殖对象。与其它经济鱼类一样, 随着养殖密度的增大, 养殖环境的恶化, 病害不断暴发。目前养

殖业经常使用抗生素等化学类药物预防疾病, 虽然能起到控制病害的作用, 但所带来的的抗生素污染, 已严重影响到我国水产品的正常出口贸

收稿日期: 2005-12-30

资助项目: 福建省重大科技项目 (20031005); 厦门市高新技术项目 (3502Z20021052)

作者简介: 杨明 (1979-), 女, 辽宁铁岭人, 博士, 主要从事海洋生物分子生物学研究。E-mail: mingyang@xmu.edu.cn

通讯作者: 王克坚, Tel: 0592-2184658, E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

易^[1,2]。因此,探索免疫防治措施,提高养殖产品的质量安全,对我国水产养殖业的健康发展至关重要。

鱼类在与外界环境微生物相互作用的过程中,主要是靠其免疫系统来抵御外来病原生物物的侵害,通过非特异性和特异性的免疫防御机制来维持机体内环境的稳定^[3]。而鳃作为硬骨鱼重要的黏膜淋巴组织,其上皮组织富含丰富的淋巴细胞、巨噬细胞和粒细胞,并且其黏液层中的非特异性免疫成分可直接与外部环境接触从而形成了抵御病原菌的先天性屏障^[4]。因此,构建真鲷鳃组织 cDNA 文库,可作为筛选真鲷免疫相关基因的重要资源。而对真鲷免疫机理的研究将有助于提高病害的免疫防治手段。

本实验室前期研究工作中,曾设计特异性引物从细菌感染的真鲷鳃和肝脏 RNA 扩增出 hepcidin 基因(GenBank AY669383、AY557619)^[5],实验中利用 hepcidin 基因的特异性引物,对构建的 cDNA 文库进行扩增,验证了文库的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

动物组织的采集 真鲷幼鱼(体重 10~20 g)购自厦门市同安区养殖鱼排,在实验室暂养 3 d 后,选择活力旺盛的幼鱼用浓度为 $1 \sim 10^8$ pfu \cdot mL⁻¹ 细菌混合物:包括金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)浸泡感染;感染后的幼鱼饲养 24 h 后取鳃组织样品,立即放入液氮中速冻,之后存于-80℃保存。

主要试剂 TRIZOL 试剂盒购自 Invitrogen 公司; PolyA Tract mRNA Isolation systems 购自 Promega 公司; Qiaquick gel Extraction Kit 为 QIAGEN 产品; cDNA、ZAP-cDNA 合成试剂盒和 ZAP-cDNA Gigapack III Gold Extract 购自 Stratagene 公司。T7、T3、S1 和 A1 寡核苷酸引物由上海生工合成。

1.2 方法

总 RNA 提取和 Poly(A) mRNA 分离 取真鲷幼鱼的鳃组织 1.5 g,放于液氮中研磨成粉末,加入 15 mL Trizol 溶液,按照试剂盒操作说明提取总 RNA,取少量提取液进行琼脂糖凝胶电泳

检测 RNA 的质量,紫外检测 RNA 的纯度及浓度。之后用 Oligo(dT) 纯化 1~5 mg 总 RNA,按照试剂盒操作说明纯化出 mRNA,紫外检测 RNA 的纯度及浓度。

cDNA 的合成及双链 cDNA 末端的补平 取 5 μ g mRNA 溶于 25 μ L DEPC 处理水中,按照试剂盒说明书操作步骤完成一链和二链的合成反应。在第二链反应物中依次加入 dNTP 混合物和高保真 DNA 聚合酶,72℃孵育 30 min,以补平 cDNA 末端。反应后用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 cDNA,转移上层水相,加入 1/10 体积的 3 mol \cdot L⁻¹ 乙酸钠(pH 5.2),二倍体积的无水乙醇,-20℃沉淀过夜。

EcoRI adaptor 的连接及末端的磷酸化反应 用 9 μ L EcoRI adaptor 溶液重悬 cDNA 沉淀,加入连接酶缓冲液, γ -三磷酸腺苷(γ -ATP)和 T4 DNA 连接酶,8℃孵育过夜进行连接反应;酶灭活后,加入 T4 多核苷酸激酶等组分,将接头末端磷酸化。

XhoI 酶消化和 cDNA 的纯化回收 在初步反应液中加入 XhoI 酶切反应缓冲液和 XhoI 内切酶(40 U \cdot μ L⁻¹),37℃孵育 1.5 h 进行酶切反应。之后加入无水乙醇,-20℃沉淀过夜。4℃下 14 000 g 离心 1 h 收集沉淀,溶解于 14 μ L 1 \times STE 缓冲液中。经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后,切下含 500~4 000 bp cDNA 片段的凝胶,按照凝胶回收试剂盒操作步骤回收双链 cDNA,洗脱出的 cDNA 溶液加入 1/10 体积的 3 mol \cdot L⁻¹ 乙酸钠(pH 5.2),2 倍体积预冷的无水乙醇,-20℃沉淀过夜后,溶解于 8 μ L 无菌水。取 1 μ L 用于定量电泳,以 30、60、100 ng \cdot μ L⁻¹ 的 λ DNA 作定量标准。

cDNA 片段的连接和体外包装 取纯化回收的 cDNA(约 100 ng)与 ZAP Express vector(1 μ g)12℃连接过夜。次日取连接反应液 3 μ L,加入到 Gigapack III Gold Extract 中进行体外包装,具体操作按说明书进行(Stratagene 公司)。

cDNA 文库的鉴定及扩增 (1) cDNA 初级文库容量的测定:取 1 μ L 包装好的反应液加入到 200 μ L 经过 MgSO₄ 处理的对数生长期的 XL1-Blue MRF' 宿主细胞中,37℃吸附 15 min 后,加入 3 mL NZY 顶层琼脂,15 μ L 0.5 mol \cdot L⁻¹ IPTG,50 μ L 25%(m/V) X-gal,混匀后铺到 NZY 琼脂平板,

37 ℃倒置培养过夜,第二天计算平板上的清亮噬菌斑。(2)cDNA 文库的扩增和滴度的测定:文库容量测定后,按照每个平板 5×10^4 pfu,将噬菌体 cDNA 包装反应物铺 NZY 琼脂平板扩增;收集 SM 缓冲液洗脱的噬菌体,加 5% (V/V) 氯仿离心,收集上清。加入 7% (V/V) DMSO 于 - 80 ℃保存。取扩增文库 10 μ L,按梯度稀释后铺 NZY 琼脂平板,以测定扩增后文库的滴度。(3)cDNA 文库插入片断的随机测定:在测定初级文库容量的平板上,随机挑取 7 个白色清亮噬菌斑,在 ExAssist 辅助噬菌体和 MgSO₄ 处理的对数生长期的 XL1- Blue MRF⁺ 宿主细胞存在下体内切割噬菌体,获得单个重组噬菌粒(phagemid)。以此为模板,用 T7 和 T3 引物进行 PCR 扩增,反应循环为 94 ℃变性 5 min;94 ℃ 40 s、55 ℃ 60 s、72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 反应产物于 1% (m/V) 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

Hepcidin 基因扩增及序列测定 用 SM 缓冲液将扩增文库做 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 倍稀释,以 2 μ L 各梯度稀释文库为模板,以 S1(5' CGA AGC AGT CAA ACC CTC CTA AGA TG 3')和 A1 (5' GAA CCT GCA GCA GAC ACC ACA TCC G 3')为引物,做 PCR 扩增。反应循环为 94 ℃变性 5 min;94 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 反应产物于 1.5% (m/

V) 琼脂糖凝胶进行电泳检测。切取特异性扩增条带,连接入 pMD18- T 载体后送 Invitrogen 公司测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取和 Poly(A) mRNA 分离

取 3 μ L 总 RNA 提取液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1),从阴极到阳极依次呈现 3 条带,分别为 28S、18S 和 5S rRNA,这证明提取的总 RNA 完整。同时利用紫外分光光度计测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值(表 1),证明 RNA 纯度也符合建库要求。

表 1 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度值

Tab.1 The quality and concentration of RNA and mRNA

	稀释倍数 diluent fold	浓度 (μ g \cdot mL ⁻¹) concentration	OD260/280	总质量 gross mass
RNA	50	32.2	2.00	1.61 mg
mRNA	2.25	3.4	2.12	7.65 μ g

2.2 消化后的双链 DNA

1% 琼脂糖凝胶电泳(图 2)显示,合成的 cDNA 大小主要集中在 1~ 2 kb,长度分布范围至 6 000 bp;由于酶切后产生的小片断核酸较多,因此在小于 100 bp 处也出现明显的亮块。经过选择长度切胶回收,可以除去较小片断及较大片断的核酸,使之后的连接反应效率得到保证。

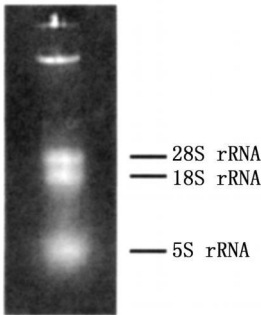


图 1 真鲷鳃组织总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 1% Gel electrophoresis of total RNA
from gills of the red seabream

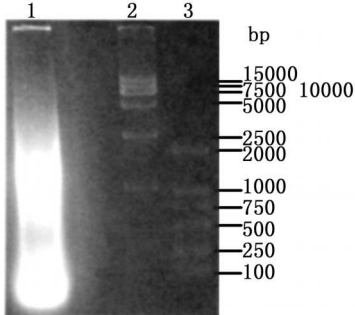


图 2 双链 DNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳
Fig.2 1% Gel electrophoresis of cDNA
1: cDNA; 2: DL15000 Marker; 3: DL2000 Marker

2.3 文库滴度和容量的测定

1 μ L 初级文库产生 350 个噬菌斑,1 个蓝斑,文库滴度为: $350 \times 1000 = 3.5 \times 10^5$ pfu \cdot mL⁻¹;文库容量为: $3.5 \times 10^5 \times 0.5 = 1.75 \times 10^5$;重组率为: $1 - 1/350 = 99.7\%$ 。4 次 10 倍稀释的 1 μ L

扩增文库产生约 100 个噬菌斑,所以扩增文库的滴度约为 1×10^9 pfu \cdot mL⁻¹。

2.4 cDNA 文库插入片断的随机测定

用 T3 和 T7 引物 PCR 扩增从初级文库随机挑选的 7 个重组噬菌粒,1% 琼脂糖凝胶电泳得到

大小 500~ 2 000 bp 的单一明亮条带(图 3)。

2.5 Hecpeidin 基因的扩增及序列分析

从梯度稀释的扩增文库中都扩增到了单一条带(图 4)。经过测序,证明为 287 bp 的 hecpeidin 片断,编码 88 个氨基酸,分析可知该序列由信号肽、前域和成熟肽三部分组成(图 5)。经 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 在线软件分析,此次获得的 cDNA 序列与本实验室报道的

从真鲷^[5]和花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[6]中分离到的 hecpeidin 序列具有较高的一致性。将推导出的氨基酸序列与部分已知鱼类的 hecpeidin 氨基酸序列进行比对(图 6),结果显示,在 C 端 hecpeidin 的 8 个半胱氨酸保守位点,所有分析的序列具有完全的一致性,而 N 端信号肽区域的相似性也较高,特别是从真鲷中发现的四条 hecpeidin,其信号肽序列完全一致。

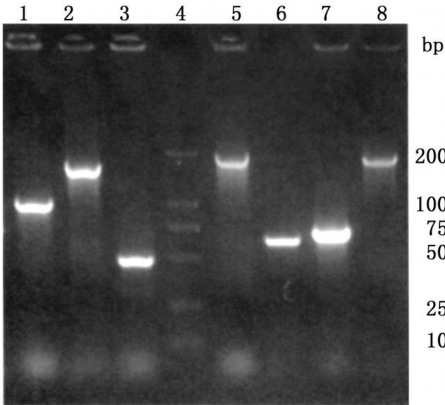


图 3 用 T3 和 T7 引物扩增随机挑选的噬菌斑的 PCR 产物电泳

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR products from seven random picked recombinant phagemids
1- 3, 5- 7: PCR product of phagemid; 4: DL2000 Marker

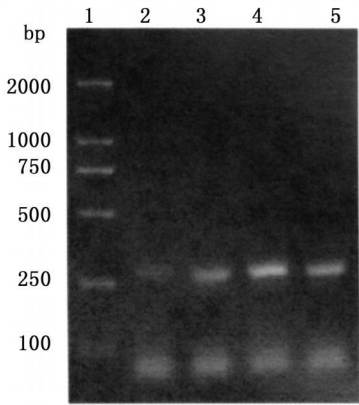


图 4 文库扩增 hecpeidin 电泳图
Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR products from cDNA library

1: DL2000 Marker; 2- 5: PCR product of 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³ dilutions of the cDNA library

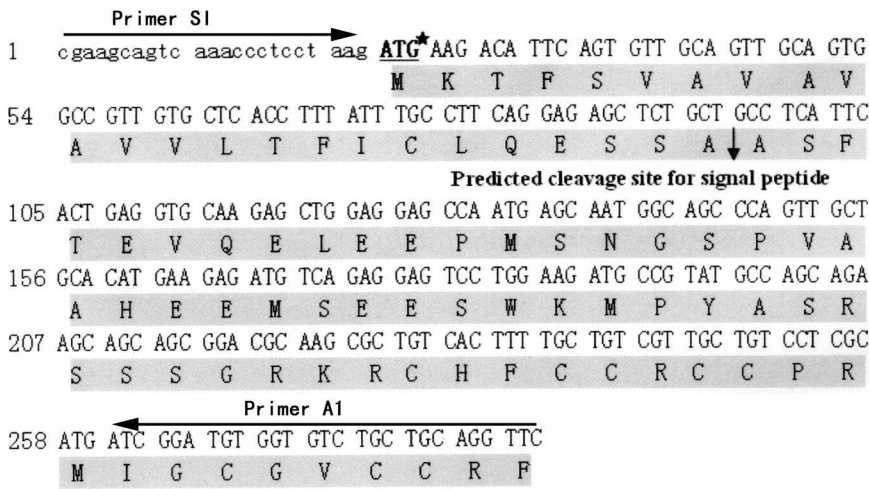


图 5 Hecpeidin 序列分析(Genbank accession number 为 AY574220)

Fig. 5 Sequence analysis of hecpeidin from gills' cDNA library

图中大写字母代表编码区;阴影部分标出氨基酸序列;星号显示起始密码子;横箭头标出引物位置;竖箭头标出预测的信号肽切割位点
Coding sequence is indicated in upper case letters and a deduced amino acid sequence is shown by shadow below the nucleotide sequence. The start codon is marked by “★”. Primer binding sites are shown with horizontal arrows (5' to 3'). The predicted position of cleavage site for signal peptide is shown by vertical arrow

3 讨论

作为构建 cDNA 文库的起始材料, 分离到 mRNA 的质量对于文库构建至关重要。在本次实验中采用两步法, 先分离得到鳃组织总 RNA, 然后应用生物素化 Oligo (dT) 进一步纯化 mRNA, 既保证了 mRNA 的产量, 也保证了质量, 从而为成功构建 cDNA 文库做好准备。另外, 本次实验采用琼脂糖凝胶回收的方法对合成的双链 cDNA 进行了长度选择, 同时去除了酶切后的衔接头片断, 保证了与 λZAP 载体连接的效率, 也增加了文库中有意重组子的比例, 为以后的文库筛选工作提供方便。

由于不同组织中基因的表达具有差异性,

cDNA 文库具有组织特异性。殷志新等^[7]和卢强等^[8]通过建立鱼类白细胞的 cDNA 文库来筛选免疫应答相关基因, 在本实验取鳃组织, 采用细菌浸泡感染, 试图刺激机体黏膜免疫反应, 使免疫相关基因的表达量增加。在杂交斑纹鲈 (*Morone chrysops*) × (*M. saxatilis*)^[9] 和真鲷^[10] 的研究中就曾发现 hepcidin 抗菌肽基因在细菌感染后表达量增加, 而在本实验中应用 hepcidin 基因的特异引物进行 PCR, 与直接扩增鳃组织 RNA 结果一致, 也同样从鳃组织构建的 cDNA 文库中扩增出了 hepcidin 基因片断, 说明该文库中包含 hepcidin 的克隆子, 这为今后筛选 hepcidin 基因的不同变体奠定了基础, 同时也为筛选真鲷其它免疫相关基因提供了重要资源。

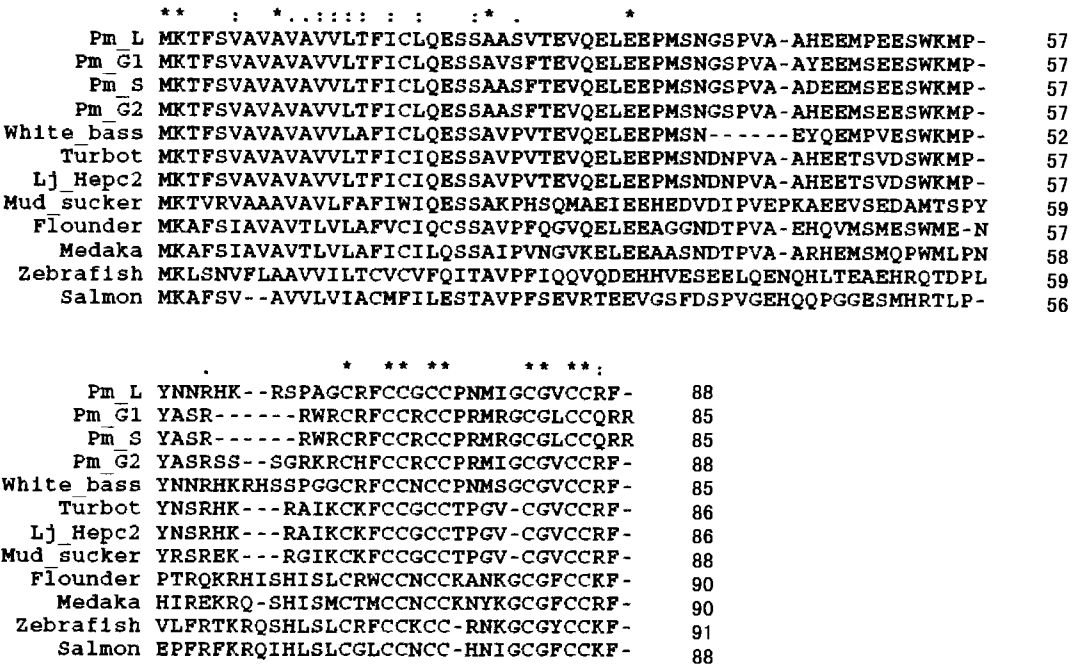


图 6 Hepcidin 氨基酸序列与其它已知部分鱼类 hepcidin 氨基酸序列的比对

Fig. 6 Alignment of amino acid sequences of hepcidin from gill cDNA library with other known fish hepcidins

“*” 标出具有完全一致的氨基酸位置; “:” 和 “.” 标出具有相似性质的氨基酸的位置

“*” Indicates positions which have a single, fully conserved residue; “:” and “.” indicates similar amino acid residues. SwissProt or GenBank accession numbers are: AAS66305 for red seabream liver (Pm_L), AAU10849 for red seabream gill (Pm_G1), AAR28076 for red seabream Spleen (Pm_S), AAS79104 for red seabream gills cDNA library (Pm_G2), P82951 for white bass, AM113708 for turbot, AAT09138 for Japan sea bass (Lj Hepc2), AW013026 for mud sucker, AW783824 for winter flounder, AU178966 for medaka, AY363454 for zebrafish, and BI468191 for Atlantic salmon

参考文献:

- [1] 李传伦, 朱清贤. 鱼病防治用药的负面效应[J]. 水产科学, 1999, 18(4): 46- 47.
- [2] 李兆新. 水生动物药物残留监控刻不容缓[J]. 中国水产, 2000, 10: 10- 11.
- [3] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞研究概况[J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648- 654.
- [4] Press C M, Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 309- 318.
- [5] 杨明, 王克坚, 周红玲, 等. 我国海水养殖真鲷分离出 hepcidin 抗菌肽新基因[J]. 高技术通讯, 2004, 14(增刊): 323- 328.
- [6] Ren H L, Wang K J, Zhou H L, *et al.* Cloning and organization analysis of a hepcidin like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21: 221- 227.
- [7] 殷志新, 翁少萍, 叶巧真, 等. 斜带石斑白细胞 cDNA 文库的构建[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 538- 541.
- [8] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 正常鳃外周血白细胞 cDNA 文库的构建[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 585- 588.
- [9] Shike H, Lauth X, Westerman M E, *et al.* Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269: 2232- 2237.
- [10] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Oryzias latipes*) [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49: 1608- 1612.

欢迎订阅 2007 年《中国学术期刊文摘》中文版和英文版

《中国学术期刊文摘》分中文版(简称 CSAC)和英文版(简称 CSAE)两种,各自收录了我国高水平学术期刊中基础科学、医学、农业科学和工程技术领域约 40 个学科的论文文摘,全景展现我国的科研成果与进展。

作为综合性科技类检索刊物,《中国学术期刊文摘》致力于将我国科学技术各领域的原创性学术成果全面、快速地向科技工作者交流、传播,其中 CSAE 是我国第一份综合性英文版科技类学术检索刊物。

《中国学术期刊文摘》由中国科学技术协会主管,科技导报社主办并负责编辑、出版、发行,对科研单位、高等院校、图书馆以及广大科技工作者检索和了解我国的科技研究成果、学术研究动向具有重要的参考价值。

《中国学术期刊文摘(中文版)》刊号为 CN 11- 3501/N, ISSN 1005- 8923, 2007 年为半月刊,大 16 开,国内定价 38.00 元/册,全年定价 912 元,邮发代号: 82- 707。《中国学术期刊文摘(英文版)》刊号为 CN 11- 5411/N, ISSN 1673- 4084, 2007 年改为月刊,大 16 开,国内定价 15.00 元/册,全年定价 180 元,邮发代号: 80- 487。

欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆订阅。

通讯地址:北京市海淀区学院南路 86 号科技导报社(邮编 100081),联系电话:010- 62103122,联系人:姚玉琴

征订信箱: wzbjb@cast.org.cn, 单位主页: [http:// www. csac. org. cn](http://www.csac.org.cn)

户名: 科技导报社, 账号: 0200001409089017271, 开户银行: 工商银行百万庄支行